

柱前-在线衍生法检测海洋鱼 胶中氨基酸含量 解决方案

1 前言

海洋鱼胶原低聚肽是以无污染或污染相对较小的深海鱼的皮、骨为原料，精制加工而成，是新型的营养健康食品的配料。以海洋鱼胶原低聚肽为原料和添加剂的化妆品、食品已经受到人们的欢迎。然而海洋鱼胶中的低聚肽含量很难直接检测到，目前的标准检测方法是先测定蛋白质水解物含量，再测试游离氨基酸含量，用蛋白水解物的含量减去游离氨基酸的含量即为海洋鱼胶中低聚肽的含量，所以海洋鱼胶中游离氨基酸含量检测至关重要。参考标准“YY/T 1695-2020 人类辅助生殖技术用医疗器械培养用液中氨基酸检测方法”中的氨基酸分析方法和标准“GB5009.28-2016 食品安全国家标准食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定”中的蛋白沉淀方法给出了海洋鱼胶低聚肽粉末样品预处理和 HPLC 分析测试方法。

依利特使用最新推出的 EClassical 3200 液相色谱仪和经典的 Supersil AQ-C18 色谱柱，为海洋鱼低聚肽粉末中对氨基酸检测提出了分析检测解决方案，供相关人员参考使用。

2 仪器设备与试剂

表2-1 海洋鱼低聚肽粉末中的氨基酸含量检测HPLC系统标准配置

序号	仪器名称	数量
1	T3200 托盘	1 台
2	D3200 紫外-可见检测器	1 台
3	P3200 高压恒流泵	1 台
4	O3200 色谱柱恒温箱	1 台
5	S3200 自动进样器	1 台
6	Kromstation 数据工作站	1 套
7	Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm	1 支

表 2-2 前处理所需设备

序号	仪器名称	数量
1	梅特勒电子天平（量感 0.0001g）	1 台
2	Sigma 离心机	1 台
3	梅特勒台式 PH 计	1 台
4	超声波清洗器	1 台
5	MiliQ 纯水机	1 台

表 2-3 前处理及样品分析所需试剂

序号	名称	规格级别
1	甲醇	色谱纯
2	乙腈	色谱纯
3	盐酸	（优级纯 36%-38%）
4	磷酸	分析纯
5	氢氧化钠	分析纯
6	亚铁氰化钾	/
7	乙酸锌	/
8	邻苯二醛（OPA）	/
9	9-芴甲氧基氯甲酸甲酯(FMOC)	/
10	乙酰半胱氨酸	分析纯
11	十二水合磷酸氢二钠	分析纯
12	十水合四硼酸钠	分析纯

实验过程中其它玻璃器皿及耗材还包括容量瓶(50 mL、1000 mL)、烧杯(10 mL、1000 mL)、圆底烧瓶(25 mL、100 mL)、量筒(10 mL、25 mL、100 mL、1000 mL)、移液枪(1 mL)及枪头、抽滤瓶(125 mL+抽滤漏斗)、中速定量滤纸、0.45 μm 针筒式过滤器、玻璃棒、50 mL塑料离心管、一次性塑料滴管、一次性PVC手套、一

次性口罩等。

3 海洋鱼低聚肽粉末中的氨基酸含量检测

3.1 样品制备

3.1.1 样品蛋白沉淀：

称2 g样品于50 mL容量瓶中，加入25 mL水，超声溶解后加入蛋白沉淀剂（亚铁氰化钾和乙酸锌溶液各2 mL），混匀后用离心机8000 r/min离心5 min，清液转移至50 mL容量瓶中。于残渣内加入20 mL水，混匀后超声5 min，用离心机8000 r/min离心5 min，清液转移至之前的50 mL容量瓶中，加水定容至刻度。

3.1.2 样品衍生：

精密量取对照品溶液50 μ L，置于5 mL塑料离心管中，精密加入0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液（pH 10.2）250 μ L，混匀，精密加邻苯二甲醛溶液50 μ L，混匀，放置30 s，精密加入茚代甲氧基酰氯溶液50 μ L，混匀，放置30 s，精密加稀释剂400 μ L。

3.2 标准品制备：

市售18种氨基酸标准溶液。其衍生方式同样品衍生方法。

3.3 溶液配置：

3.3.1 流动相A：称取十二水合磷酸氢二钠4.5 g，十水合四硼酸钠4.75 g，加水1000 mL，用盐酸调pH至8.2。

3.3.2 流动相B：取甲醇450 mL，乙腈450 mL，水100 mL，混匀。

3.3.3 0.4 mol/L硼酸盐缓冲液（pH 10.2）：取硼酸24.73 g，加水800 mL溶解，用

40%氢氧化钠溶液调pH至10.2，然后加水稀释至1000 mL。

3.3.4 邻苯二甲醛溶液：取邻苯二甲醛80 mg，乙酰半胱氨酸97 mg，加0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液（pH 10.2）7 mL，加乙腈1 mL溶解。

3.3.5 茚代甲氧基酰氯溶液：取茚代甲氧基酰氯40 mg，加乙腈8 mL溶解。

3.3.6 稀释液：取流动相A 100 mL，加磷酸0.5 mL，混匀。

3.3.7 0.1 mol/L盐酸溶液：取盐酸9 mL，加水适量使成1000 mL，摇匀。

3.3.8 0.1 mol/L氢氧化钠溶液：称取4 g氢氧化钠，加新沸过的冷水使成1000 mL，摇匀。

3.4 色谱条件

流动相梯度：

时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0	95	5	1.6
6	90	10	1.6
8	90	10	1.6
10	84	16	1.3
23	58	42	1.0
24	57	43	1.6
30	50	50	1.6
31	0	100	1.6
34	0	100	1.6
35	95	5	1.6
40	95	5	1.6

色谱柱：Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm

检测波长：338 nm(0-31 min，一级氨基酸)；

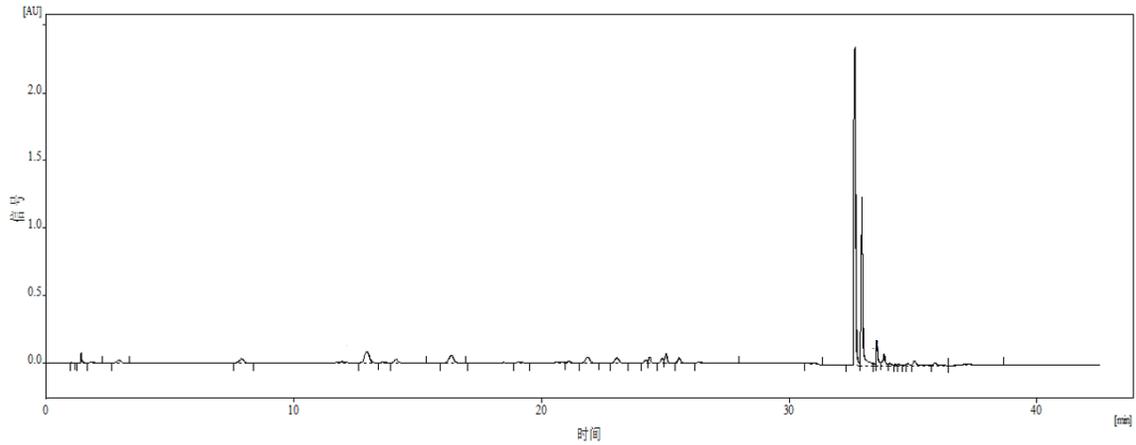
262 nm(31-40 min，二级氨基酸)。

进样体积：40 μ L

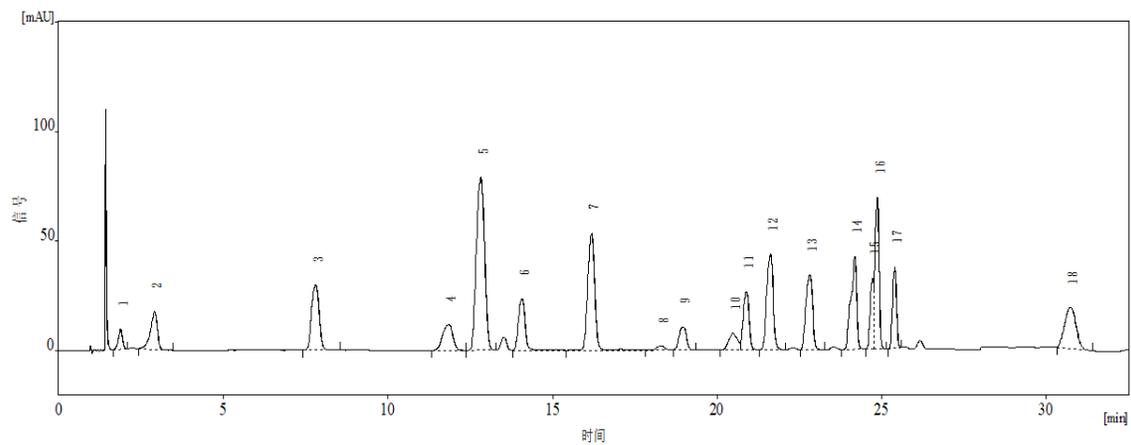
柱温：50 °C

4 18种氨基酸混标测试（实验）结果

18种氨基酸分析谱图



18种氨基酸谱图放大图



5 结论

本实验参考标准“YY/T 1695-2020 人类辅助生殖技术用医疗器械培养用液中氨基酸检测方法”中的氨基酸分析方法和标准“GB5009.28-2016 食品安全国家标准食

品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定”中的蛋白沉淀方法对海洋鱼低聚肽粉末中氨基酸成分进行分析检测。测试结果数据符合标准要求，结果表明：该系统稳定性良好，定量结果准确。

走进依利特
www.eliteHPLC.com

来到依利特
大连公司
中国·辽宁·大连市高新技术产业园区七贤岭学子街2号
苏州公司
中国·江苏·苏州工业园区金鸡湖大道99号苏州纳米城西北区14栋501

了解依利特
销售服务免费热线：400-66-35483 转 3
(非工作时间请拨打13604289881)

尊享依利特
售后服务免费专线：400-66-35483 转1(仪器)/ 转2(耗材)
(非工作时间请拨打13604289881)

分享依利特



抖音官方账号



微信售后小程序



依利特视频号



依利特服务号



依利特订阅号

本应用中信息仅供参考，提供数据除注明外为本公司特定条件下的实验数据。